第5卷第4期
1984年11月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 5, No. 4
Nov., 1984

大鼠快慢肌单纤维肌球蛋白轻链的分析比较

任惠民 陈秀芳 章生良

（中国科学院上海生理研究所）

从整块肌肉抽提的肌球蛋白，其轻链类型因肌肉收缩的快慢而有区别，即快肌的肌球蛋白有三条轻链，慢肌的肌球蛋白只有二条轻链（Sarker等，1971；Lowey和Risby，1971），它们分别属于不同的肌球蛋白同功酶，这在鸡（Hoh，1978）和兔（Hoh，1979）都是这样。另外，在神经肌肉的发育过程中，一旦有了神经控制，便使起初只合成快型轻链的肌肉，逐步向合成慢型轻链的慢肌分化（Rubinstein和Kelly，1978）。然而，快肌和慢肌不同的轻链图谱特征，是否也表现在肌纤维的快慢类型上呢？这很少见到报道。我们曾观察到单肌纤维的肌球蛋白有二个成份，它们之间的比值和各自的电泳迁移率可以作为区别二类不同单肌纤维的特征（章生良、任惠民，1983）。我们认为既然快肌纤维和慢肌纤维的肌球蛋白成份各有特征，那末，单肌纤维的肌球蛋白轻链图谱，当然也应该能反映单肌纤维的快、慢类型了。本文目的就是利用毛细管凝胶电泳对单肌纤维的轻链分析，来探讨这个问题。

材 料 和 方 法

单肌纤维制备 成年大鼠体重约200克左右，放血后立即取出比目鱼肌(Sol)和伸趾长肌（EDL）。豚鼠体重约400克左右，猫体重约4公斤，麻醉后放血，取出比目鱼肌。在低于20°C的室温中，于含10%甘油的0.1M pH7.3磷酸缓冲液中，任其自然收缩，剥取单肌纤维，长度约1厘米左右，放入尖底小玻璃管中，加入4微升"样品缓冲液"，在沸水浴中处理5分钟，以备电泳。

整块肌肉的肌球蛋白抽提 基本是按Tsao（1953）的肌球蛋白抽提法。将EDL或Sol在放于冰浴的容器中剪碎，以0.3M KCl、0.15M pH6.5磷酸钾缓冲液，提取二小时，在4°C，4000转/分离心20分钟，弃去碎渣，将上清液用冷重蒸馏水稀释10倍后得到沉淀，此沉淀再用少量的上述KCl抽提液溶解，冷重蒸馏水稀释，沉淀，如此反复二次，最后得到的沉淀即为肌球蛋白，溶解后以备电泳。

本文1983年2月4日收到，1983年6月21日收到修改稿。

"样品缓冲液" 按Weeds和Hall（1975）方法配制。含1%SDS、1%DTT、25%甘油的0.01*M* pH8.3 Tris-bicene缓冲液，加溴酚兰作指示剂。

凝胶电泳 在0.8×60毫米毛细玻璃管中制得含0.1%SDS、0.01*M* pH7.0磷酸钠缓冲液的10%聚丙烯酰胺凝胶，隔1—2天后使用。电泳时施加电压36伏，电泳时间约3小时。凝胶用0.25%考马斯亮兰G-250、7%乙酸、50%甲醇溶液染色。以7%乙酸浸洗脱色。

标准蛋白配制 以Serva出品的标准蛋白：细胞色素C，肌红蛋白，胰蛋白酶原A，卵白蛋白，用0.1*M* pH7.3磷酸缓冲液配成。与样品同样条件进行SDS聚丙烯酰胺毛细管凝胶电泳，并且计算出各个蛋白的迁移率，按已知蛋白分子量绘出标准曲线如（图1）。

肌原纤维ATP酶的染色 按Essen等（1975）的肌原纤维ATP酶组织化学方法，将单肌纤维贴附在盖玻片上，冰冻抽干后，先在含0.03*M* $CaCl_2$-0.05*M*NaCl，0.05*M*

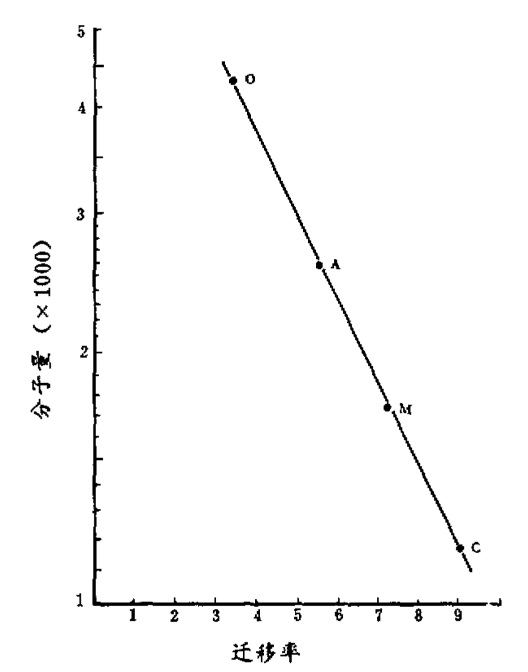


图1 已知蛋白的分子量标准曲线图

（O＝卵白蛋白 M＝肌红蛋白 A＝胰蛋白酶原A C＝细胞色素C）

注：横坐标系数应为小数

pH10.3的甘氨酸缓冲液中，38°C预保温15分钟，再在0.036*M* $CaCl_2$、30毫克/10毫升的ATP、0.04*M* pH9.4巴比妥缓冲液中温育20分钟后，用$CoCl_2$、$(NH_4)_2S$依次反应显色，在显微镜下观察各条纤维的黑色程度，不同的黑色程度反映了ATP酶活力的强弱。

毛细管凝胶的轻链图谱照相，并用薄板层析扫描仪绘出。

实 验 结 果

(一) 大鼠EDL和Sol单肌纤维肌球蛋白的轻链图谱

以单肌纤维为材料，经“样品缓冲液”在沸水浴中处理，电泳法分析了208根Sol单肌纤维和161根EDL单肌纤维的轻链图谱，结果发现，在208根单肌纤维中，具有二条轻链的有134根，其余74根在LC_3的位置上有比较明显的染色带（图2），它的分子量约相当于EDL的LC_3，为13600，这种有LC_3的单肌纤维占所研究分析Sol纤维的35.6%。而在161根EDL的单肌纤维中，有LC_3的为145根，占90.1%（表1）。这些与通常的ATP酶染色分类是颇相符合的（Hoh, 1979; Lutz, 1978）。但是从单肌纤维的整个电泳图谱来比较，Sol纤维与EDL纤维的轻链图谱却是很不一样的。第一：LC_1和LC_2的分子量略有差异。Sol和EDL的LC_1分子量分别为26000和23700，$P<0.001$；Sol和EDL的LC_2分子量分别为17200和16000，$P<0.001$。第二：LC_1与原肌球蛋白的迁移率之差亦完全不同。对此，我们又在相似条件下对142根EDL和157根Sol的单肌纤维进行电泳所获得

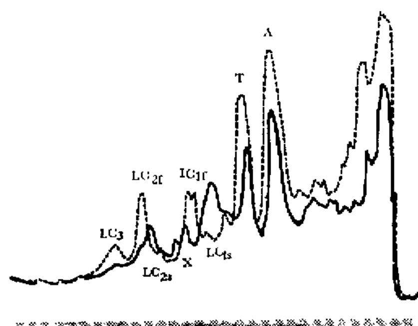


图2　解离后EDL和Sol单纤维的凝胶电泳图谱
(----, EDL　▬▬, Sol)
LC_1f—快型轻链1　LC_2f—快型轻链2　LC_1s—慢型轻链1　LC_2s—慢型轻链2　LC_3—轻链3　A—肌动蛋白　T—原肌球蛋白

表1　各种单肌纤维的蛋白电泳图谱（表观分子量×1000）

	A (肌动蛋白)	T (原肌球蛋白)	LC_1	"X"	LC_2	LC_3	有LC_3的纤维占所测纤维的%
大鼠 Sol	41.6 (208)	34.9 (208)	26.0 (208)	22.1 (164)	17.2 (208)	13.6 (74)	35.6%
大鼠 EDL	41.2 (161)	34.2 (161)	23.7 (161)		16.0 (161)	13.1 (145)	90.1%
猫 Sol	39.7 (60)	33.7 (60)	25.6 (60)	21.8 (60)	16.4 (60)	11.9 (34)	56.7%
豚鼠 Sol	40.8 (40)	34.7 (40)	25.0 (40)	21.0 (40)	16.6 (40)	13.3 (40)	100.0%

（括号内为所测纤维数）

的轻链图谱，计算它们各自LC_1与原肌球蛋白的迁移率之差时发现，EDL纤维和Sol纤维的分布可以清楚地划分开来（图3）。我们之所以采用这个指标来计算划分快慢肌纤维的理由是因为每根凝胶的电泳条件不可能完全一致，如果稍有不一（如胶龄长短、毛细玻璃管粗细不匀等），那么，在计算同一蛋白的分子量时，就会形成部分的离散值。特别是对于分子量相差不太大的蛋白来说，在电泳条件不完全一致的情况下，也就自然发生某些值的相互交叠，这样就不易将它们彼此间的值绝对划分开来。为此我们采取了计算LC_1与原肌球蛋白的迁移率之差来区别EDL与Sol，则可改善上述分子量相差不太大（EDL的LC_1和Sol的LC_1分子量分别为26000和23700）而发生交叠的情况。我们采用的原肌球蛋白系按一般的肌肉蛋白成分在凝胶电泳中的序列推定的。Porzio（1977）分析兔和John（1976）分析小鼠的原肌球蛋白均是在相应的电泳位置，所以在我们的实验中，用原肌球蛋白作为电泳时肌纤维蛋白成份的本身"内标志"是完全可以的，也是当然合理的。所以，如果用第一和第二个指标来衡量的话，无论是Sol中的"快型"还是"慢型"（即有无LC_3存在）都与EDL有显著差别，反之，无论是EDL中的"快型"还是"慢型"也都与Sol有差别。除上述第一与第二点的EDL与Sol轻链图谱不同之外，另外个别其他蛋白的位置也有所不同。例如在Sol单纤维的轻链图谱上，在LC_1与LC_2之间

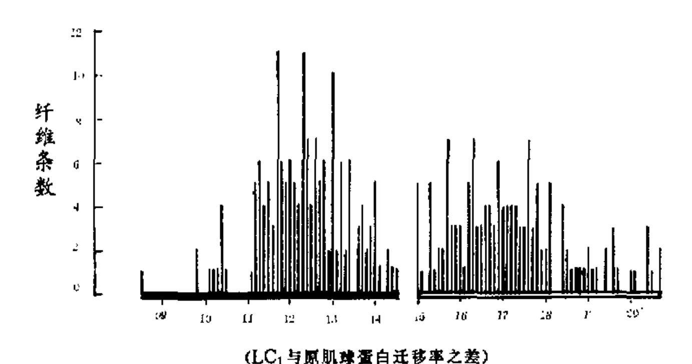


图3 EDL和Sol纤维按电泳轻链迁移率的分布图

（▬, Sol ▭, EDL）

往往出现一个"X"染色带（图2）。以上结果说明Sol和EDL的轻链图谱是不一样的，但Sol或EDL它们自身肌纤维之间，按轻链图谱却是相当一致的。可见有无LC_3仅仅只代表Sol纤维之间的某些差别。若以大鼠整块EDL和Sol抽提得到的肌球蛋白，经8 M尿素解离，再对含有0.1%SDS、0.1%DTT的0.01M pH 7磷酸钠缓冲液透析后，在毛细管凝胶电泳图上，可以看到EDL的肌球蛋白具有三条轻链，而Sol的肌球蛋白只有二条明显的轻链，但是在LC_3的位置上仍有极淡的染色带（图4），其分子量也相当于EDL的LC_3，为13000。如果认为这少量的LC_3是Sol中快纤维成份所含有的，当然是合理的。因为这与用单肌纤维逐根解离肌球蛋白，再进行毛细管凝胶电泳所见到的有些Sol纤维具有LC_3，乃是一致的。

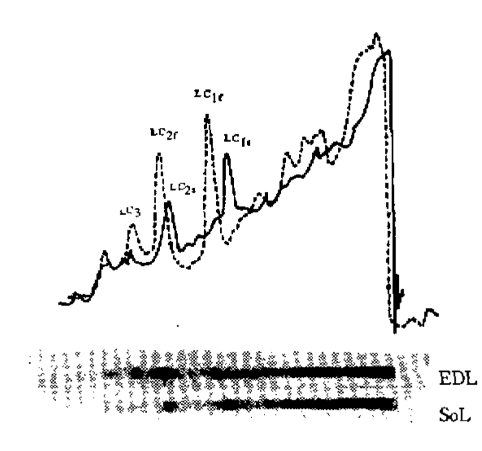


图 4　从EDL和Sol抽提的肌球蛋白轻链电泳图谱
（----，EDL　━━，Sol）
（说明同图 2）

（二）用三根Sol单肌纤维混合在一起的轻链分析来推导大鼠Sol纤维之间轻链图谱的一致性

在上面的实验中，我们已经注意到，凡是看得见有明显LC_3的Sol单肌纤维，它的其他各条蛋白带在电泳图谱上一般都是较深的，反之则较淡（图 2 所示Sol为蛋白带在电泳图谱上属中等深浅者）。我们估计，这可能与所取纤维的长度，或者很有可能与纤维所含收缩蛋白量的多少有关系。如果LC_3的出现与否，真是由于蛋白含量本身的原因，那么，增加纤维数量则将势必大大增加出现LC_3的机会。从上面的结果已经得知，有LC_3的Sol纤维约占其总数的 1/3，以此为依据进行计算，随机地将三根Sol单肌纤维并在一起进行电泳，那么其中只要有一根纤维有LC_3的话，在凝胶上将能看到LC_3的带；有二根单肌纤维或三根单肌纤维有LC_3，当然就更可以看到LC_3的带了；只有当三根单肌纤维都没有LC_3时，才将真正出现只有二条轻链的情况。如果按这种简单的组合方式计算，Sol的三根单肌纤维并在一起进行电泳，出现LC_3的机会将可能达到67%。为此我们分析了64组三根单肌纤维加在一起电泳的毛细管凝胶轻链图谱，结果有57组具有LC_3的带，占总数的89%，这远远超过了可达67%的估算值。这就可以说明，每根Sol单肌纤维可能都是含有LC_3的，只是有些纤维的LC_3含量太低，因而在凝胶上看不见；有些纤维甚至三根并在一起，用目前的方法，也依然难以鉴别出来。

（三）从几种动物Sol单肌纤维的轻链分析，来推导大鼠Sol纤维轻链图谱的一致性

从ATP酶组织化学来观察，豚鼠的Sol是100%的纯慢纤维（本实验室资料）。我们同样用毛细管凝胶电泳分析了豚鼠Sol单肌纤维的肌球蛋白轻链图谱，结果也是100%的单肌纤维具有LC_3，其分子量为13300（表 1）。豚鼠的Sol虽是纯慢肌，但其肌球蛋白却有三条轻链，可见大鼠的Sol纤维可能都有LC_3，也是可以接受的。我们还用同样的电泳法分析了长短粗细不一的猫Sol单肌纤维的肌球蛋白轻链图谱，发现在60根猫的Sol纤维中，具有LC_3的有34根，占总数的56.7%（表 1），这显然要比大鼠Sol纤维出现LC_3的多得多。所以LC_3的出现与否，就很可能与所取纤维标本的长度、粗细有关。我们注意到猫的Sol单肌纤维凝胶电泳图谱中，17根蛋白染色较深的，LC_3也较明显；18根蛋白染色中等的，LC_3就较淡；而25根蛋白染色很淡的，LC_3就不能见到。这种情况与在大鼠Sol单肌纤维所表现的是同一道理。因此，可以这样认为，在大鼠Sol纤维中，它们各自的LC_3或多或少都是存在的，只不过它们各自的LC_3含量有多少罢了。

（四）大鼠快、慢肌单纤维的轻链与ATP酶的关系

在具有同样ATP酶活力的肌纤维中，如果分析其他代谢酶系的情况，可以有很大差别（Essen等，1975；Pool等，1979）。但是肌原纤维ATP酶活力的大小，一般则都被认为是区别快纤维还是慢纤维的标志。所谓ATP酶活力的大小，在组织化学方法上，是以碱性预处理后，快纤维比慢纤维染色要深得多，若以酸性预处理，结果则相反。以此推论，作为肌原纤维的ATP酶与肌球蛋白轻链的特征，应该有直接的关系。我们试图在同一根单肌纤维上进行ATP酶和轻链的对照分析，看其是否有直接的关系。因此，我们将大鼠EDL或Sol的单肌纤维，先截取一小段（约2毫米），进行ATP酶的组织化学染色，余下的大段纤维，依旧用同样的电泳法分析其轻链。初步的结果表明，在以碱性预处理后，ATP酶活力强的EDL纤维轻链图谱，有的有LC_3，有的没有LC_3；而同样条件处理，获得了不同ATP酶活力的Sol纤维，它们轻链图谱的LC_3，也是有的存在，有的不存在（表2）。由此可见ATP酶与肌球蛋白轻链的特征并不平行，两者间不显示出有直接的关系。

表2 单肌纤维ATP酶活力和轻链条数的关系

	ATP酶染色	轻链条数	所测纤维根数
EDL	黑	3	19
		2	3
Sol	黑	3	3
		2	7
	灰	3	3
		2	9
	白	3	6
		2	12

讨 论

以往人们都是从整块肌肉抽提肌球蛋白，将它解离电泳后，分析轻链图谱的，得出了快肌有三条轻链，慢肌只有二条轻链的结论。但是，我们用不同的实验，对大鼠Sol肌纤维的轻链图谱进行分析与论证，发现在LC_3的位置上实际都有染色带存在，也就是说慢肌似乎也存在三条轻链，这与所报道的显然不相符合。所以就我们所说的Sol的LC_3，它究竟真是轻链，还是其他的蛋白成份，这还有待于进一步弄清楚。

在碱性条件下，组织化学ATP酶染色表明，在快肌中ATP酶活力强的纤维多，慢肌则正好相反。但是，我们从分析单肌纤维ATP酶与轻链特征这二者关系时发现，它们并不平行。因为无论是ATP酶活力强的EDL纤维或是ATP酶活力弱的Sol纤维，它们都可以是有的有LC_3存在，有的没有LC_3存在，所以ATP酶活力强弱并不与轻链的条数相关。从我们的实验中发现，尽管EDL与Sol彼此是很不一样的，但它们各自自身的纤维之间轻链图谱却是一致的。Julian等（1981）分析了兔比目鱼肌及腰大肌的单肌纤维收缩速度与轻链图谱的关系，认为尽管已知兔的比目鱼肌是颇为不纯的肌肉，但比目鱼肌

只出现慢类型轻链，而在腰大肌中却只出现快类型的轻链。这就是说，在二块快慢不同的肌肉，其轻链类型可以不相同，而同一块肌肉中的纤维，其轻链类型都是一致的。这与我们的结果是类似的。因此，EDL与Sol肌肉的组织化学ATP酶活力染色表明，ATP酶活力与轻链类型也不相关。所以，肌原纤维ATP酶为什么在酸或碱处理后有分化，看来也许不能由轻链的条数和类型来说明，究竟是什么因素引起肌原纤维ATP酶在酸或碱处理后产生分化这一问题，还有待于进一步研究。

Pette和Schnez（1977）提出，在兔胫骨前肌由快到慢的改造过程里，它的单肌纤维可以同时存在快型和慢型轻链。Mizusawa等新近指出，大鼠Sol肌肉中，Ⅰ型纤维同时具有快类型和慢类型的轻链，并认为这是一种“杂种”型的肌球蛋白。在本文的前面，我们也已提到过在Sol单肌纤维电泳图谱上，LC_1与LC_2之间有一条“X”染色带，其位置正好相当于LC_{1f}的位置。这是否就是Mizusawa所指的那种“杂种”型轻链呢？就我们实验来说，不管纤维是否同时存在两种类型的轻链，只要是纤维有慢型轻链存在，那么，在我们分类的指标上，就都把它归纳在慢纤维类型。至于这个“X”带是否肌球蛋白所有还是肌浆网系中某些成份，也有待进一步探讨。

小　结

按单肌纤维的轻链图谱分析，大鼠Sol肌肉中约有1/3的纤维在LC_3位置上具有明显的染色带，而其余的纤维，不是不存在这个染色带，只是由于其浓度太低，不能显示而已。但是不管Sol纤维是否有LC_3出现，它的单纤维轻链电泳图谱与EDL单纤维轻链电泳图谱还是截然不同的，如LC_1及LC_2的分子量各有大小、LC_1与原肌球蛋白的迁移率之差各不相同，以及Sol轻链图谱出现“X”染色带等。关于Sol肌肉的每根纤维其实可能都有LC_3这个问题，我们已用三根单肌纤维合并的办法，分析猫和豚鼠Sol单纤维的办法得到了证明。在同一条单肌纤维的ATP酶活力与轻链特征的对照比较的实验中，初步观察到ATP酶活力与轻链的条数和类型并不相关。

参 考 文 献

章生良，任惠民 1983 大鼠快、慢肌纤维肌球蛋白的特征。动物学报 29（2），105—111。

Essen, B., E. Janssen, J. Henrikssen, A. N. Tayler & B. Saltin 1975 Metabolic characterisation of fiber types in human skeleatal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 95: 153—165.

Hoh, J. F. Y. 1978 Light chains distribution of chicken skeletal muscle myosin isoenzymes. *FEBS Lett.* 90: 297—300.

Hoh, J. F. Y. & G. P. S. Yeoh 1979 Rabbit skeletal myosin isoenzyme from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscles. *Nature* 280: 321—323.

John, H. A. 1976 Myofibrillar proteins of developing and dystrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 64: 116—121.

Julian, F. J., R. I. Moss & G. S. Waller 1981 Mechanical properties and myosin light chain composition of skinned muscle fibres from adult and new-born rabbits. *J. Physiol.* 311: 201—218.

Lowey, S & D. Risby 1971 Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature* 234: 81—85.

Lutz, H., M. Ermini & E. Jenny, 1978 The size of the fibre populations in rabbit skeletal muscle as revealed by indirect immunofluorescence with anti-myosin sera. *Histochem.* 57: 223—235.

Mizusawa, H., A. Takagi, H. Sugita & Y. Toyokura 1982 Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fibre of rat soleus muscle. *J. Biochem.* (Tokyo) 91: 423—425.

Pette, D. & V. Schnez 1977 Coexistence of fast and slow myosin light chains in single muscle fibres during transformation as induced by long-term stimulation. *FEBS Lett.* 83: 128—130.

Pool, Chr. W., H. Moll & P. C. Dieqenbach 1979 Quantitative succinate-dehydrogenase histochemistry Ⅱ, Variations in histochemical succinate dehydrogenase activity in different cross-sections of the same muscle fiber. *Histochem.* 64: 273—278.

Porzio, M. A. & A. M. Pearson 1977 Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophy. Acta,* 490: 27—34.

Rubinstein, N. A. & A, M. Kelly 1978 Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat. *Developmental Biol.* 62: 473—485.

Sarker, S., F. A. Streter & J. Gergely 1971 Light chains of myosins from white, red and cardiac muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 946—950.

Tsao, T. C. 1953 Fragmentation of the myosin molecule. *Biochim. Biophy. Acta* 11: 368—382.

Weeds, A. G. & R. Hall 1975 Characterization of myosin light chains from histochemically identified fibres of rabbit psoas muscle. *FEBS Lett.* 49: 320—324.

COMPARISON OF MYOSIN LIGHT CHAIN ANALYSIS BETWEEN SINGLE FIBERS OF FAST AND SLOW MUSCLES IN RAT

Ren Huimin Chen *X*iufang Zhang Shenggen

(Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica)

According to the analysis on light chain pattern of single fibers, there were one third of fibers in rat soleus muscle which had a distinct staining band at the position of LC_3, while the remaining fibers did not show such band by present method due to its minute quantity. No matter whether or not LC_3 appeared, the electrophoretic patterns of fiber proteins between Sol and EDL were completely different, including the differences of molecular weights of LC_1, LC_2 and the distance travelled along the gel between LC_1 and tropomyosin of fibers of the two muscles. Experiments have been performed to see if LC_3 exists in each fiber of soleus muscle. We deduced it by analyzing randomly three fibers in one electrophoretic gel to show the chance of appearance of LC_3 by simple probability calculation and a great exceed (89%) over the 'theoretical' value (67%) in probability was achieved. For the same purpose, we also analyzed guinea pig soleus which was known to have pure slow fibers, and conform to that, 100% of fibers tested contained LC_3; and finally 56% of cat soleus fibers was found to contain LC_3 whose appearnce were clearly related to their intensity of protein staining on electrophoretic gels.

Attempts have also been made to explore the corelation between light chain characteristics and ATPase activity of fibers. Preliminary results indicated that there were no such parallel relationship.